

**MÔNICA PAUL FREITAS**

**SOBREVIVÊNCIA DE *Pseudomonas aeruginosa*, COLIFORMES TOTAIS,  
*Escherichia coli* E ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS EM ÁGUA  
DE RIO *IN NATURA*.**

Monografia apresentada para a obtenção do  
Título de Bacharel em Ciências Biológicas, no  
Setor de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Ida Chapaval Pimentel.

Co-orientadores: Prof<sup>a</sup>. Marita M. M. Blaskowski

Prof. Carlos Roberto Dalke

**CURITIBA  
2004**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, em especial a meus pais, pelo carinho, compreensão e por nunca medirem esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

Às minhas orientadoras e amigas, Professora Ida Chapaval Pimentel e Professora Marita M. M. Blaskowski, pela orientação, experiência, incentivo e compreensão, durante minha vida no laboratório.

Ao Professor Carlos Roberto Dalke pela sua atenção e conhecimentos compartilhados.

Ao Carlos Rattmann pelo apoio e incentivo a realização deste trabalho.

À bióloga Audrei Bastos pela colaboração com dados para o trabalho.

Ao pessoal do laboratório, em especial a Professora Yanê de Carvalho e ao Rodrigo Stuart, pela ajuda durante a parte laboratorial do trabalho.

Ao Alan, cujo carinho, amor, e muita paciência, foram indispensáveis para a realização do meu trabalho.

As minhas amigas, Eve, Pa, Roxane e Gi pela amizade, carinho incentivo e paciência para agüentar minhas crises de mau humor.

As minhas amigas Kissy e Elisa pela amizade e incentivo (mesmo de longe).

Aos amigos que entre conversas e festas proporcionaram momentos de alegria e descontração.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

E à Deus por guiar meu caminho e permitir que mais uma etapa da minha vida fosse vencida.

“O que distingue um cientista de um não cientista, é que o primeiro confessa imediatamente a própria ignorância. De fato só a base dela é que surge seu desejo de conhecer. Se soubesse tudo não se colocaria nenhuma pergunta, não daria início a nenhuma pesquisa”.

Heinz von Foerster

“Esse trabalho dedico aos meus pais Junior e Marli”.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
RESUMO .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	03
2.1 BACTÉRIAS PRESENTE NA ÁGUA .....	03
2.2 CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GRUPO COLIFORME .....	04
2.3 <i>E. coli</i> COMO INDICADOR DE POLUIÇÃO FECAL .....	04
2.4 <i>P. aeruginosa</i> .....	06
2.5 FUNGOS PRESENTES NA ÁGUA .....	07
2.6 FUNGOS ZOOSPÓRICOS E HYPHOMYCETES AQUÁTICOS .....	09
3. OBJETIVOS .....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	12
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS .....	12
4.2 MEIOS DE CULTURA .....	12
4.2.1 Meio Cetrimide ou Ágar Cetrimide .....	12
4.2.2 Meio Teague ou Ágar de eosina e azul de metileno .....	13
4.2.3 Meio P .....	13
4.2.4 Meio Ágar Simples .....	13
4.2.5 Caldo Acetamida .....	14
4.2.6 Caldo Asparagina .....	14
4.2.7 Meio BDA .....	14
4.2.8 Meio Endo .....	15
4.3 SOLUÇÕES .....	15
4.3.1 Solução Tampão de $MgCl_2$ .....	15
4.3.2 Solução Tampão de $KH_2PO_4$ .....	16
4.3.3 Solução "Twenn 80" .....	16
4.4 CORANTE E CLAREADOR .....	16
4.4.1 Lactofenol Azul de Algodão (CRUZ, 1981) .....	16

4.4.2 Lactofenol de Amann (CRUZ, 1981) .....	16
4.5 TESTE DOS TUBOS MÚLTIPLOS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>P. aeruginosa</i> .....	17
4.6 PROVAS BIOQUÍMICAS .....	18
4.6.1 Meio P .....	18
4.6.2 Prova da citocromo oxidase (KOVACS, 1956) .....	18
4.6.3 Coloração de Gram .....	19
4.6.4 Prova da Catalase .....	19
4.7 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E <i>E. coli</i> .....	19
4.7.1 Técnica da membrana filtrante .....	20
4.7.2 Procedimentos da técnica .....	21
4.8 DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS .....	21
4.8.1 Detecção e quantificação de fungos .....	21
4.8.2 Purificação dos isolados .....	22
4.8.3 Identificação dos isolados .....	22
4.8.4 Técnica do microcultivo (KERN e BLEVINS, 1999) .....	22
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	24
5.1 PESQUISA DE <i>P. aeruginosa</i> .....	24
5.1.1 Análise do NMP (nº mais provável) no caldo acetamida .....	24
5.1.2 Análise das provas bioquímicas da citocromo-oxidase e catalase para confirmação da identificação de <i>P. aeruginosa</i> .....	28
5.1.3 Amostras semeadas em meio P .....	30
5.2 ANÁLISE DOS COLIFORMES TOTAIS E FECAIS .....	30
5.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS .....	31
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	38
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	39
<b>ANEXOS</b> .....	42

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -	VALORES MÁXIMOS DE COLIFORMES PARA CONTROLE DE POTABILIDADE DA ÁGUA .....	05
TABELA 02 -	VALORES DE NMP (Nº MAIS PROVÁVEL) X 10 <sup>3</sup> ENCONTRADOS PARA PESQUISA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NO CALDO ACETAMIDA NAS DEZ SEMANAS DE ANÁLISE .....	25
TABELA 03 -	PROVA BIOQUÍMICA DA CITOCROMO - OXIDASE PARA A CONFIRMAÇÃO DE <i>P. aeruginosa</i> ISOLADAS NAS ÁGUAS AMOSTRADAS NOS RIOS IGUAÇU, IRAÍ E PASSAÚNA .....	28
TABELA 04 -	PROVA BIOQUÍMICA DA CATALASE PARA CONFIRMAÇÃO DE <i>P. aeruginosa</i> ISOLADAS NAS ÁGUAS AMOSTRADAS NOS RIOS IGUAÇU, IRAÍ E PASSAÚNA .....	29
TABELA 05 -	FUNGOS ISOLADOS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO IGUAÇU .....	32
TABELA 06 -	FUNGOS ISOLADOS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO IRAÍ ....	33
TABELA 07 -	FUNGOS ISOLADOS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO PASSAÚNA .....	34

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>P. aeruginosa</i> NA AMOSTRA DO RIO IGUAÇU.....	25
FIGURA 02 - TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>P. aeruginosa</i> NA AMOSTRA DO RIO IRAÍ .....	26
FIGURA 03 - TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>P. aeruginosa</i> NA AMOSTRA DO RIO PASSAÚNA .....	28

## RESUMO

No presente trabalho foi pesquisada a incidência e o tempo de sobrevivência de coliformes totais, *E.coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água "in natura" no período entre os dias 25 de setembro e 4 de dezembro de 2003. As amostras foram coletadas em frascos de cinco litros, antes da água entrar na estação de tratamento, no rio Iguaçu e nas barragens dos rios Iraí e Passaúna, que abastecem a cidade de Curitiba-PR e região metropolitana. Simultaneamente foram realizados o isolamento e a identificação dos fungos presentes nestas mesmas amostras. As análises dos fungos foram realizadas com três amostragens de cada rio, sendo a primeira no dia 03 de outubro de 2003, a segunda no dia 30 de outubro de 2003 e a terceira no dia 28 de novembro de 2003. A partir dos resultados deste trabalho foi possível observar que os coliformes totais tiveram seu maior tempo de sobrevivência no rio Iguaçu onde permaneceram viáveis por sete semanas. Os coliformes fecais apresentaram um tempo de sobrevivência relativamente menor, sendo detectados até a quinta semana. *Pseudomonas aeruginosa* foi detectada até a nona semana, totalizando aproximadamente sessenta e três dias. Um total de dezesseis gêneros de fungos filamentosos foram identificados nas amostras; *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp.; *Bipolaris* sp., *Cylindrocladium* sp., *Epicoccum* sp., *Fonsecaea* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Rhizoctonia* sp., *Scopulariopsis* sp., *Trichoderma* sp., fungos dematiáceos e *Mycelia sterilia* I e *Mycelia sterilia* II. Os fungos encontrados nas amostras de água dos rios são todos considerados fungos de solo, o que com os resultados obtidos nas análises bacteriológicas confirmam a condição de poluição das águas destes rios.

Palavras chaves: Água de rio, coliformes totais, *E. coli*, *P. aeruginosa*, fungos filamentosos.



## 1. INTRODUÇÃO

O meio ambiente constitui hoje um dos temas essenciais de política governamental e uma das maiores preocupações dos cidadãos, seja nos países industrializados ou não. Cada vez mais um número maior de pessoas vêem na degradação ambiental uma ameaça à saúde e ao bem estar social.

Todos os problemas relativos aos contaminantes ambientais estão, de uma maneira ou de outra, associados ao crescente processo de industrialização, verificado desde o final do século XIX, onde, ao lado do incremento da pesquisa, do desenvolvimento e da difusão de novas tecnologias os processos de produção de seus produtos, têm contribuído para por em perigo ou causar prejuízos à saúde do homem e dos ecossistemas.

A água é um recurso natural que vem sendo contaminado em decorrência do desenvolvimento industrial, do crescimento demográfico e da ocupação do solo de forma intensa e acelerada. Isto vem provocando o comprometimento dos recursos hídricos para o consumo humano, recreação e múltiplas atividades, aumentando consideravelmente o risco de doenças de transmissão de origem hídrica.

A maioria das doenças microbianas do sistema digestivo resulta da ingestão de água ou alimento contaminado com microrganismos patogênicos ou com suas toxinas. Estes patógenos geralmente penetram no suprimento de água após serem disseminados nas fezes de animais e pessoas infectadas por eles. Assim as doenças microbianas do sistema digestivo são tipicamente transmitidas por um ciclo fecal-oral. Além da contaminação por microrganismos entéricos, outros patogênicos responsáveis por doenças de pele, ouvido e garganta são relevantes quando a água destina-se a atividades que envolvem contato corporal (TORTORA, 2000).

A contaminação fecal da água é considerada um risco a saúde humana, e há uma preocupação quanto ao nível de bactérias do grupo coliforme em fontes naturais. A origem destes coliformes pode ser a contaminação fecal humana, de animais domésticos e selvagens, como também de sistemas sépticos inadequados, ou transbordamentos de esgotos. Estas bactérias podem representar risco a saúde ou

ainda indicar a presença de outros microrganismos patogênicos como, por exemplo, o vírus da hepatite A (GORDON, 2001).

Testes de rotina simples da qualidade bacteriológica de água de consumo são feitos para detectar a presença de bactérias do grupo coliforme, que atuam como indicadores de poluição fecal, e evidenciam a possibilidade de presença de microrganismos patogênicos. A presença de coliformes na água indica poluição e sua ausência, é indicativo de uma água bacteriologicamente potável, devido ao fato destes microrganismos serem mais resistentes nesse ambiente que as bactérias patogênicas de origem intestinal.

A patogenicidade dos microrganismos é relativa, dependendo de fatores como produção de toxinas e resistência do hospedeiro.

Gosto e odor anormal na água potável são associados à presença de microrganismos procarióticos como bactérias, actinomicetos e cianobactérias, porém fungos podem estar envolvidos (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

Apesar da ampla ocorrência dos fungos, não se tem dado importância ao significado ecológico da sua presença na água. Estes microrganismos têm sido estudados quando detectado sua patogenicidade, ou com relação a sua função como recurso energético, ou ainda nas suas atividades em processos naturais de purificação e suas funções na formação do sedimento.

Os fungos podem ser encontrados em diferentes habitats aquáticos, como rios, lagos, estuários, águas residuais, etc. A correlação entre a densidade dos fungos e o acúmulo de matéria orgânica, sugere que os fungos podem ser usados como indicadores de poluição. Infelizmente, nenhuma espécie ou grupo em especial tem sido identificado como importante neste sentido (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

Devido a sua ampla capacidade enzimática, os fungos são capazes de degradar a maioria dos compostos naturais e sintéticos, incluindo alguns pesticidas (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

Alguns fungos estão sendo encontrados na água potável devido à resistência dos mesmos ao método de tratamento da água, ou, porque entraram na rede de abastecimento após o tratamento. Tenham eles sobrevivido ao tratamento ou introduzidos posteriormente, os esporos se mantêm viáveis na água por um período de tempo relativamente extenso (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BACTÉRIAS PRESENTES NA ÁGUA

Segundo SOUSA<sup>1</sup> citado por SOUSA e SOUZA (2001), embora não haja nenhuma certeza sobre a existência de bactérias estritamente aquáticas, a opinião mais difundida entre os vários autores é que a maioria das bactérias encontradas em ambientes aquáticos é de origem do solo, e chegou na água devido à chuva ou pela introdução acidental natural ou uma como consequência direta da atividade humana. Porém, toda massa de água tem sua comunidade bacteriana, embora estas comunidades podem variar grandemente nos grupos presentes e o número de células.

De acordo com TORANZO<sup>2</sup> e SOUSA<sup>1</sup> citado por SOUSA e SOUZA (2001), entre as bactérias melhores adaptadas à vida em terra ou água estão os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (por exemplo, *P. aeruginosa*). Porém, outros grupos podem estar presentes em várias ocasiões dentro de água doce, inclusive Enterobacteriaceae, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e bactérias anaeróbicas, por exemplo, *Clostridium*.

<sup>1</sup>SOUSA, J. A. Estudo epidemiológico em duas truticulturas do norte de Portugal e caracterização dos agentes bacterianos e virais de maior impacto em aquacultura. **PhD Thesis**, Universidade do Porto, Porto, Portugal, (1996).

<sup>2</sup>TORANZO, A. E.; COMBARRO, P.; CONDE, Y. ; BARJA, J. L. Bacteria isolated from rainbow trout reared in fresh water in Galicia (Northwestern Spain): taxonomic analysis and drug resistance patterns. **In-Fish and Shellfish Pathology**, London: N.W. Ellis. Academic Press, p. 141-152, (1985).

## 2.2 CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GRUPO COLIFORME

Segundo a portaria nº 518 do Ministério da Saúde as bactérias consideradas coliformes totais são bacilos Gram negativos aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase negativos capazes de se desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos (surfactantes, detergentes), que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  em vinte e quatro/ quarenta e oito horas e que podem apresentar a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase. Esta definição abrange varias espécies de enterobactérias, incluídas nos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*.

Os coliformes termotolerantes são um subgrupo das bactérias do grupo coliforme que fermentam a lactose a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  em vinte e quatro horas, tendo como principal representante a *Escherichia coli* de origem exclusivamente fecal presente 100% nas fezes de humanos.

## 2.3 *Escherichia coli* COMO INDICADOR DE POLUIÇÃO FECAL

A *E. coli* é uma bactéria do grupo coliforme que fermenta a lactose e manitol com produção de ácido e gás a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  em vinte e quatro horas, produz indol a partir do triptofano, oxidase negativa, não hidrolisa uréia e apresenta as atividades das enzimas  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glucoronidase, sendo considerada a representante oficial e específica, indicadora de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos (PORTARIA nº 518, DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Este microrganismo é o principal organismo utilizado como indicador de poluição fecal, pois satisfaz as exigências de indicador ideal, tais como: presença em água poluída e ausência em água não poluída, sobrevivência melhor e por mais tempo na água do que os microrganismos patogênicos, e presença na água juntamente com os patogênicos, porém em maior número que estes, entre outras (TORTORA, 2000).

A *Escherichia coli*, parte da flora intestinal normal do homem, está sempre presente nas fezes sem causar nenhum sintoma, sendo as cepas enteropatogênicas

de *E. coli* correspondentes a menos de 1% da população de espécies presente em água poluída (TORTORA, 2000).

SAVAGEAU (1983) observou que o ciclo de vida de bactérias como *E. coli* envolve uma transição entre dois ambientes distintos, e que há uma diferença significativa em recursos oferecidos as bactérias no trato gastrointestinal de mamíferos considerado hábitat primário e o solo, água e sedimento, considerado hábitat secundário.

Os níveis de contaminação toleráveis e os padrões sanitários de qualidade da água dependem da finalidade de uso da mesma. Segundo a Portaria nº 518 de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde, publicada no Diário Oficial de 26 de março de 2004, quanto ao critério microbiológico, a água deve ser de tal qualidade que não apresente riscos a saúde do consumidor e estar em conformidade com as características abaixo:

TABELA 01- VALORES MÁXIMOS DE COLIFORMES PARA CONTROLE DE POTABILIDADE DA ÁGUA.

PARÂMETROS	VALOR MÁXIMO PERMITIDO
ÁGUA PARA O CONSUMO HUMANO	
<i>E. coli</i> ou coliformes totais termotolerantes	Ausência em 100 mL
ÁGUA NA SAÍDA DO TRATAMENTO	
Coliformes totais	Ausência em 100 mL
ÁGUA PÓS-TRATAMENTO	
<i>E. coli</i> ou coliformes totais termotolerantes	Ausência em 100 mL
Coliformes totais	Sistemas que analisam 40 ou mais amostras por mês: Ausência em 100 mL em 95% das amostras analisadas por mês.
	Sistemas que analisam menos de 40 amostras por mês: Apenas uma amostra/mês poderá - apresentar resultado positivo.

FONTE: Portaria nº 518 de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde.

## 2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Segundo ANDREW et al. (2000) o gênero *Pseudomonas* compreende o grupo de bactérias com maior diversidade e significância ecológica do planeta. Membro deste gênero são encontrados em grande número na maioria dos ambientes naturais (terrestre, marinho e dulcícola).

*Pseudomonas aeruginosa* é considerada uma bactéria patogênica oportunista que pode ser isoladas de várias fontes naturais como solo, água, fezes de animais e humanos (OLIVEIRA et al. 1983). Tem especial importância em águas balneáveis podendo causar infecções de ouvido, olhos, pele, etc (ROITMAM, 1987).

São bacilos Gram negativos retos ou ligeiramente curvos, aeróbios; a maioria é móvel por meio de um flagelo polar; são capazes de oxidar glicose e outros derivados do carbono, e em geral são citocromo oxidase positiva (LENNETTE, 1989).

Membros do gênero *Pseudomonas* possuem capacidade notável para degradar uma gama extensiva de substratos, incluindo compostos aromáticos, derivados halogenados e resíduos orgânicos (ANDREW et al., 2000).

*Pseudomonas aeruginosa* produz endotoxinas e exotoxinas que respondem por boa parte de sua patogenicidade. Exceto pela infecção superficial de pele e otite externa a infecção por essa bactéria é rara em pessoas saudáveis. A contaminação por esse microrganismo é uma preocupação importante em muitos hospitais, devido a sua resistência relativa aos antibióticos (TORTORA, 2000).

Segundo TORTORA (2000), *P. aeruginosa* é um membro deste grupo que produz um pigmento azul denominado piocianina, é capaz de sobreviver em qualquer ambiente úmido e podem ser disseminadas no solo e na água. Cerca de 95% das cepas produzem piocianina, um pigmento hidrossolúvel azul.

Reyes et al.<sup>3</sup> citado por KONEMAN et al. (1999) observaram que certas cepas mucosas de *P. aeruginosa* podem não produzir pigmento e, portanto podem ser identificadas de maneira errônea se for utilizado somente a produção de pigmento como critério de identificação. O odor de uvas também é um indício quando se examina o crescimento em ágar. As colônias são grandes, podem ser mucosas ou secas e com

freqüência são invasoras. Algumas cepas de *P. aeruginosa* podem produzir pigmentos de outras colorações como, por exemplo, piorrubina (roxo), piomelanina (marrom a negro), e pioverdina (amarelo).

## 2.5 FUNGOS PRESENTES NA ÁGUA

Fungos, incluindo as leveduras, são seres eucariotos, aclorofilados, heterotróficos e com parede celular relativamente rígida.

As colônias de um fungo filamentoso são descritas como vegetativas, porque são compostas de células envolvidas no catabolismo e no crescimento. Os talos destes fungos são denominados de hifas e consistem de filamentos longos de células conectadas (TORTORA, 2000).

Na maioria dos fungos filamentosos, as hifas contêm paredes com septos transversais, os quais dividem as hifas em distintas unidades celulares. Em algumas poucas classes de fungos, as hifas não contem septo e apresentam-se como células longas e contínuas com muitos núcleos e, são chamadas de hifas cenocíticas (TORTORA, 2000).

Fungos são habitantes naturais do solo e água e algumas espécies podem se tornar patogênico ou oportunista ao homem. Fungos patogênicos são agentes de uma variedade de infecções, e parte destas são mais freqüentemente observadas em pacientes imunocomprometidos.

Os fungos encontrados no meio aquático incluem membros dos Mastigomicetos (fungos com esporos flagelados), Zigomicetos, Ascomicetos, e Deuteromicetos (TAN e LIM, 1984).

<sup>3</sup>REYES, G.; BALE, M. J.; CANNON, W. H. et al. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocyanin production in Tech agar. **Journal Clinical Microbiology**, v. 13, p. 456-458, 1981.

A ocorrência e distribuição da maioria destes fungos são afetadas pela presença de poluição orgânica na água. De acordo com esse autor a poluição da água tende a reduzir a diversidade de espécies, aumentando o número de indivíduos de espécies menos sensíveis. (COOKE<sup>4</sup>, apud TAN e LIM, 1984)

Para BRANCO (1986), os fungos encontrados em águas poluídas provêm, geralmente do solo e de raízes de plantas, bem como das fezes de animais e do próprio homem. E algumas destas espécies, principalmente as do solo e fezes, são adaptadas às condições de matéria orgânica.

Em água corrente não poluída existe um grande número de espécies representantes dos chamados autênticos fungos aquáticos (espécies com zoósporos flagelados), Hyphomycetes aquáticos e fungos de solo (incluindo fungos leveduriformes). Águas moderadamente poluídas contêm esporos ou células dos três grupos acima citados, porém possuem um número relativamente maior de fungos de solo em relação aos dois outros grupos. E em águas muito poluídas predominam os fungos de solo, incluindo também as leveduras (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

A análise de rios e de redes de tratamento de água revela que não é comum encontrar fungos patogênicos ao homem e aos demais vertebrados mesmo em águas poluídas, porém esta hipótese não pode ser totalmente descartada (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

Existem dois padrões de crescimento dos fungos na água, o primeiro envolve a produção de zoósporos móveis ou gametas, e um segundo no qual as estruturas de crescimento são imóveis em todas as fases do seu ciclo de vida (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

<sup>4</sup>COOKE, W. B. Our mouldy earth. Cincinnati, US Department of Interior Federal Water Pollution Control Administration, Advanced Waste Treatment Research Laboratory, 1970.



## 2.6 FUNGOS ZOOSPÓRICOS E HYPHOMYCETES AQUÁTICOS

A maioria dos fungos encontrados em rios e lagos, os quais se reproduzem assexuadamente por esporos uniflagelados e possuem crescimento determinado, pertencem à classe dos Chytridiomycetes. Fungos com crescimento indeterminado, reprodução assexuada por esporos biflagelados e reprodução sexuada envolvendo oogônia e anterídio, fazem parte grupo dos Oomycetes (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

Em águas poluídas a tendência é uma redução do número de espécies de ambos os grupos, porém esta é mais significativa nos Chytridiomycetes (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

Alguns Chytridiomycetes podem parasitar o fitoplâncton e no caso de uma epidemia de infecções causadas por fungos, a atividade destes parasitas pode afetar a composição das comunidades fitoplanctônicas (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

Segundo INGOLD<sup>5</sup> e NILSSON<sup>6</sup> citados por SUBERKROPP, MICHELIS, LORCH, OTTOW (1988), em fluxos de água doce, Hyphomycetes aquáticos são os fungos dominantes que colonizam e degradam resíduos de folhas. Os habitats mais favoráveis para estes fungos parecem ser fluxos rápido-correntes com vegetação ribeirinha abundante.

Os Hyphomycetes de água doce são um grupo especializado de fungos que ocorrem em folhas deterioradas e submersas e ocasionalmente em troncos de algumas angiospermas. O micélio é ramificado e septado e o conidióforo projeta-se para dentro da água, onde o conídio se desenvolve e é liberado. Os conídios maduros podem ser encontrados na superfície da maioria dos rios, córregos e lagos.

<sup>5</sup>Ingold, C.T. An Illustrated Guide to Aquatic and Waterborne Hyphomycetes. **Freshwater Biological Association Scientific Publication**. n. 30, Ferry House, Ambleside, 96 pp. 1975.

<sup>6</sup>Nilsson, S. Freshwater hyphomycetes, taxonomy, morphology and ecology. **Symb. Bot. Ups.** v. 18, p. 1-130, 1964.

Mesmo suspensos em água por um longo período de tempo os conídios não germinam. Contudo se ele vier a repousar em uma superfície sólida, o tubo germinativo é produzido em poucas horas.

Estes fungos habitam preferencialmente água bem oxigenada com baixos níveis de poluição (SUBERKROPP, MICHELIS, LORCH, OTTOW, 1988), contudo também são encontrados em rios mais calmos e, ocasionalmente contaminados, lagos estagnados ou temporários e no solo. (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

### 3. OBJETIVOS

- Detectar a presença de coliformes totais, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos nas barragens dos rios Iraí e Passaúna e no rio Iguaçu, que abastecem Curitiba e região metropolitana;
- Determinar o tempo de sobrevivência destas bactérias em água *in natura*.
- Isolamento e identificação dos fungos encontrados nas amostras.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de água foram coletadas em frascos de cinco litros na barragem dos Rios Iraí e Passaúna e no rio Iguaçu, que abastecem a cidade de Curitiba-PR e região metropolitana. Essa coleta foi realizada antes da água entrar na estação de tratamento, sendo chamada de análise bruta da água.

As análises bacteriológicas foram iniciadas no dia 25 de setembro, finalizadas no dia 4 de dezembro de 2003, perfazendo um total de 10 semanas consecutivas.

O trabalho foi dividido em duas etapas paralelas, uma na qual foram realizadas as análises bacteriológicas e outra onde o foco de estudo foi o isolamento e identificação de fungos presentes na mesma amostra.

As análises dos fungos foram realizadas com três amostragens de cada rio, sendo a primeira no dia 03 de outubro de 2003, a segunda no dia 30 de outubro de 2003 e a terceira no dia 28 de novembro de 2003.

### 4.2 MEIOS DE CULTURA

#### 4.2.1 Meio Cetrimide ou Ágar Cetrimide

• Peptona de gelatina	20,0 g
• Glicerina líquida	10 mL
• Cloreto de magnésio	1,4 g
• Sulfato de potássio	10,0 g
• N-Cetil-N,N, N-trimetilamonio brometo	0,3 g
• Ágar-ágar	12,6 g
• Água destilada	100 mL

#### 4.2.2 Meio Teague ou ágar de eosina e azul de metileno

• Peptona de gelatina	10,0 g
• Lactose	5,0 g
• Sacarose	5,0 g
• Fosfato dipotássico	2,0 g
• Ágar	13,5 g
• Eosina	0,4 g
• Azul de metileno	0,065 g
• Água destilada	1000 mL

#### 4.2.3 Meio P

• $MgCl_2$	1,4 g
• $K_2SO_4$	10,0 g
• Peptona	20,0 g
• Ágar	12,6 g
• Glicerina líquida	10,0 mL
• Água destilada	1000 mL

#### 4.2.4 Meio ágar simples

• Extrato de carne	4,0 g
• Peptona	10,0 g
• Ágar	15,0 g
• NaCl	4,0 g
• Água destilada	1000 mL

#### 4.2.5 Caldo Acetamida

• NaCl	5,0 g
• K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,39 g
• MgSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,5 g
• Acetamida	10,0 g
• Vermelho de fenol	0,012 g
• Água destilada	1000 mL

#### 4.2.6 Caldo Asparagina

• KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
• MgSO <sub>4</sub>	1,0 g
• Asparagina	6,0 g
• Água destilada	1000 mL

Em todos os meios de cultura os ingredientes foram adicionados a 1000 mL de água destilada e fervidos até a completa dissolução do meio. O pH foi ajustado para 7,2 com hidróxido de sódio a 4% e/ou ácido clorídrico a 10%, e os meios foram autoclavados a 121°C e 1 atm. por vinte minutos.

#### 4.2.7 Meio BDA

• Batata	200,0 g
• Dextrose	20,0 g
• Ágar	15,0 g
• Água destilada	1000 mL

As batatas foram cortadas em pedaços pequenos e cozidas em 1000 mL de água destilada por 15 minutos. O caldo resultante foi filtrado e o que foi perdido por

evaporação foi completado com água destilada perfazendo 1000 mL. A esse caldo adicionou-se dextrose e ágar corrigindo o pH para 6,8 com hidróxido de sódio e/ou ácido clorídrico 1N. O meio foi autoclavado a 121°C e 1 atm. por vinte minutos.

#### 4.2.8 Meio Endo

• Triptose	10,0 g
• Tiopeptona	5,0 g
• Casitona ou tripticase	5,0 g
• Extrato de levedura	1,5 g
• Lactose	12,5 g
• NaCl	5,0 g
• $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,375 g
• $\text{K}_2\text{HPO}_4$	4,375 g
• Lauril sulfato de sódio	0,05 g
• Desoxicolato de sódio	0,10 g
• Sulfito de sódio	2,10 g
• Ágar	15,0 g
• Fucsina básica	1,05 g
• Água reagente	1000 mL

### 4.3 SOLUÇÕES

#### 4.3.1 Solução Tampão de $\text{MgCl}_2$

• $\text{MgCl}_2$	1,25 mL
• Água destilada	1000 mL

Após o preparo a solução foi usada na concentração de 81,1 g/L.

#### 4.3.2 Solução tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4$

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5,0 mL
- Água destilada 1000 mL

Após o preparo a solução foi usada na concentração de 68,0 g/L.

#### 4.3.3 Solução "Tween 80"

- "Tween 80" 1 mL
- Água destilada 99,9mL

Todas as soluções foram autoclavadas por 20 minutos a 121°C e 1 atm.

### 4.4 CORANTE E CLAREADOR

#### 4.4.1 Lactofenol Azul de Algodão (CRUZ, 1981)

- Ácido láctico 20,0 g
- Cristais de fenol 20,0 g
- Glicerina 20,0 g
- Azul de algodão 0,05 g
- Água destilada 20,0 mL

Os cristais de fenol foram fundidos em banho-maria, sendo os demais compostos adicionados em seguida. Após vinte e quatro horas a solução foi filtrada.

#### 4.4.2 Lactofenol de Amann (CRUZ, 1981)

- Ácido láctico 10,0 g



• Ácido fênico	10,0 g
• Glicerina	20,0 g
• Água destilada	10,0 mL

#### 4.5 TESTE DOS TUBOS MÚLTIPLOS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa*

Este teste foi realizado com baterias de cinco tubos de ensaio para cada uma das três diluição de cada amostra.

As amostras foram diluídas em água tamponada com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na concentração de 68,0 g/L. e  $\text{MgCl}_2$  na concentração de 81,1 g/L, sendo utilizadas as diluições de 1:10, 1:100, 1:1000. Foi semeada 1 mL de amostra diluída, com o auxílio de pipetas esterilizadas, em tubos de ensaio contendo 9 mL Caldo Asparagina (item 4.2.6), os quais foram incubados a  $\pm 36^\circ\text{C}$  por noventa e seis horas. Após este intervalo de tempo, os tubos onde houve resultado positivo, turvação do meio e em alguns casos fluorescência do mesmo, foram semeados em tubos contendo Caldo Acetamida (item 4.2.5) com o auxílio de alças de platina previamente esterilizada. Estes tubos foram incubados também a  $\pm 36^\circ\text{C}$  por quarenta e oito horas. A alteração da cor do indicador de pH de vermelho para púrpura indica resultado positivo e confirma a presença da *Pseudomonas aeruginosa* na amostra. A leitura dos tubos positivos foi feita utilizando-se tabela do número mais provável (ANEXO 2).

Os tubos onde foram observados resultados positivos foram semeados em placas de Petri contendo meio Ágar Cetrimide (item 4.2.1), meio seletivo para *Pseudomonas aeruginosa*, e incubados a  $\pm 36^\circ\text{C}$  por quarenta e oito horas (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

Simultaneamente a esse processo, as amostras positivas, foram também semeadas em placas de Petri com o Meio Teague (item 4.2.2), meio seletivo para bactérias Gram negativas. As amostras que cresceram em ambos os meios foram

submetidas a provas bioquímicas da catalase e oxidase, e quando se observou resultado positivo, estas foram semeadas em tubos de ensaio contendo o Meio P (item 4.2.3), o qual estimula a produção de pigmento pela *P. aeruginosa*.

Estes testes foram realizados a fim de detectar a presença de *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras coletadas.

## 4.6 PROVAS BIOQUÍMICAS

### 4.6.1 Meio P

O meio P (item 4.2.3) foi usado para intensificar a produção de pigmento pela *Pseudomonas aeruginosa*. Para essa prova, foram feitos repiques estriados na superfície do meio inclinado. Os tubos foram incubados a aproximadamente 37°C por vinte e quatro horas, e posteriormente colocados à temperatura ambiente para intensificar a produção de pigmento.

### 4.6.2 Prova da citocromo-oxidase (KOVACS, 1956).

A prova da citocromo-oxidase foi utilizada para demonstrar o metabolismo oxidativo das bactérias. Para a realização desta prova foram utilizadas tiras para oxidase, impregnadas com  $\alpha$ -naftol e para-fenilenodiamina. As tiras foram colocadas assepticamente, em uma placa de Petri esterilizada e receberam uma gota de água estéril e inóculos das colônias presentes no meio ágar cetrimide (item 4.2.1) para a reação da citocromo-oxidase. Após alguns minutos, onde havia bactérias não fermentadoras houve reação, e as tiras passaram da cor branca para um azul escuro, confirmando o metabolismo oxidativo dessas bactérias.

#### 4.6.3 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi usada para identificar se as bactérias isoladas das amostras eram Gram-negativas ou Gram-positivas.

O corante púrpura e o iodo utilizado nesta coloração se combinam com cada bactéria e a coram de violeta escuro. As bactérias que retêm esta cor violeta após serem submetidas ao álcool são chamadas Gram-positivas. E as bactérias que perdem a cor violeta e adquirem a coloração rosada do contracorante utilizado são chamadas de Gram-negativas (TORTORA, 2000).

#### 4.6.4 Prova da catalase

A catalase é uma potente enzima que degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A água oxigenada se forma como produto final da oxidação metabólica de carboidratos e é letal para as bactérias.

Esta prova foi utilizada para demonstrar a capacidade de degradação da molécula de peróxido de hidrogênio pelas bactérias contidas nas amostras.

Para isso, adicionou-se algumas gotas de água oxigenada a 10% nas amostras. A formação de pequenas bolhas (liberação de O<sub>2</sub>), confirma a presença da catalase, e conseqüentemente a presença de *P. aeruginosa*.

#### 4.7 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E *E. coli*

Esta etapa do projeto foi realizada no Laboratório da SANEPAR. A detecção e quantificação da contaminação da água por *E. coli* e coliformes totais foi realizada utilizando a técnica da membrana filtrante (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

As membranas filtrantes que são utilizadas em análises bacteriológicas de água, são discos plásticos flexíveis, altamente porosas, com cerca de 0,15 mm de

espessura e 47 mm de diâmetro, constituída de 400 a 500 milhões de poros de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Esta técnica baseia-se na filtração a vácuo de volumes de amostras adequadas, através de membranas filtrantes, com porosidade padronizada (0,45  $\mu\text{m}$ ), menores que uma célula bacteriana. As bactérias, se presentes, ficam retidas na superfície da membrana, a qual, é, então transferida assepticamente para a superfície do meio de cultura, contido em uma placa de Petri. A incubação da placa deve ser invertida, para que o princípio da capilaridade possa alimentar as possíveis bactérias presentes sobre a membrana.

#### 4.7.1 Técnica da membrana filtrante

Esta técnica consistiu em retirar a porta filtro da embalagem estéril e adequá-lo co assepsia no receptor. Com uma pinça flambada e esfriada, foi colocada uma membrana filtrante estéril sobre a base do receptor de membranas. Acoplou-se a parte superior (porta filtro volumétrico), tendo o cuidado de não danificar a membrana e evitar vazamento da amostra no processo de filtração. A bomba de vácuo foi ligada, o volume a ser analisado foi medido na proveta estéril, e despejado o volume no porta filtro. O vácuo foi liberado, coma haste em sentido horizontal, na base do equipamento, e procedeu-se à filtração.

Após a filtração, o porta filtro foi lavado com 30 mL de água de diluição estéril, por três vezes. Fechou-se o vácuo, com a haste do porta membrana, em sentido vertical, e cuidadosamente, retirou-se a membrana do porta filtro pelas bordas, e colocou-a sobre os meios de cultura sólidos, contidos em placas de Petri, as quais foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  para coliformes totais e  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  para coliformes fecais ou termotolerantes, por vinte e quatro horas. Posteriormente ao período de incubação selecionou-se placas contendo entre vinte e oitenta colônias típicas de coliformes.

Em meio de cultura Endo as colônias de coliformes incubadas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  são vermelhas escuras, com brilho verde metálico característico e quando incubadas a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  as colônias possuem uma coloração azul intenso.

O resultado foi expresso em U.F.C. (unidade formadora de colônia) / 100 mL (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

#### 4.7.2 Procedimento da técnica

A área útil de filtração na superfície da membrana é de 47 mm, a qual contém em média 136 quadradinhos de área útil de filtração. Contar quatorze quadradinhos e aplicar a média. Ao valor encontrado, multiplicar a média por 136 (área útil de filtração), e se a amostra for diluída, aplicar o fator de diluição no resultado.

### 4.8 DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS.

#### 4.8.1 Detecção e quantificação de fungos

Para a detecção e quantificação dos fungos foi usada a técnica de *Pour Plate*, utilizando o meio BDA (item 4.1.7) adicionando do antibiótico estreptomicina ( $100\text{ }\mu\text{g/L}$ ). Este procedimento foi repetido três vezes durante as dez semanas, uma na primeira semana, uma na quarta e a última na nona semana.

As amostras foram utilizadas "in natura", sendo analisadas a cada semana quinze placas inoculadas com as amostras de água do rio Iguaçu e das barragens dos rios Iraí e Passaúna.

Em cada placa foi colocado 1 mL da amostra e 10 mL de meio BDA, sendo estes homogeneizados através de movimentos de rotação.

Após a solidificação do meio, estas placas foram incubadas a uma temperatura entre  $20^{\circ}\text{C}$  e  $24^{\circ}\text{C}$ , recebendo iluminação indireta (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

A leitura foi feita após, cinco e sete dias, e a contagem foi feita através da observação do número de colônias formadas. Um pequeno fragmento de cada colônia formada foi repicado em tubos de ensaio contendo o meio BDA e incubados a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  para posterior purificação.

#### 4.8.2 Purificação dos isolados

A purificação foi realizada colocando um pouco do micélio das colônias em tubos de ensaio contendo 2,0 mL de solução de "TWEEN 80" 0,01%v/v esterilizado (item 4.2.3) e submetidos à agitação por dois minutos com o auxílio de um agitador. Após a agitação, com o auxílio de uma micropipeta, foram retirados 30  $\mu\text{L}$  da suspensão de esporos, semeados em placas de Petri contendo meio BDA e, incubados a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  por três a sete dias dependendo da taxa de germinação dos esporos.

#### 4.8.3 Identificação dos isolados

Após o crescimento das colônias, para a identificação dos isolados e observação de suas estruturas de reprodução (sexual e assexual), foi usada a técnica de microcultivo (KERN e BLEVINS, 1999) e literatura especializada (ELLIS, 1971, 1976; BARNETT e HUNTER, 1972; AINSWORTH, SPARROW e SUSSMAN, 1987; ARX, 1974; KONEMAN e ROBERTS, 1987; LARONE, 1987).

#### 4.8.4 Técnica do microcultivo (KERN e BLEVINS, 1999)

Para esta técnica foram utilizadas placas de Petri previamente esterilizadas contendo uma lâmina e um pedaço de algodão. Um cubo de meio de cultura BDA (item 4.2.7) foi cortado e colocado sobre a lâmina no interior da placa. Repicou-se o fungo nos quatro lados superiores do cubo, posteriormente cobrindo-o com uma lamínula esterilizada. O algodão no interior da placa foi umedecido com água destilada esterilizada e a placa foi incubada por 7 à 14 dias à  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente a lamínula

foi retirada e colocada sobre outra lâmina contendo uma gota de Lactofenol azul de algodão (item 4.4.1) ou Lactofenol de Amann (item 4.4.2). As lâminas preparadas foram observadas em microscópio óptico.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 PESQUISA DE *P. aeruginosa*.

A pesquisa de *P. aeruginosa* foi realizada através da capacidade desta bactéria utilizar a asparagina e a acetamida como única fonte de carbono e nitrogênio.

Como testes confirmativos utilizou-se a degradação do peróxido de hidrogênio, produção de pigmentos e o teste da citocromo-oxidase.

No presente trabalho foi observada na terceira e quarta semana num total de quinze tubos, a produção de pigmentos azul-esverdeados característicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Nas demais semanas apesar das demais provas bioquímicas evidenciarem a presença de *P. aeruginosa* não foi possível observar a produção de pigmentos.

Este resultado concorda com Reyes<sup>3</sup> et al. citados por KONEMAN et al. (1999) que demonstraram que aproximadamente 95% das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* produzem pigmento e que certas cepas mucosas de *P. aeruginosa* podem não produzir pigmento e, portanto podem ser identificadas de maneira errônea se for utilizado somente a produção de pigmento como critério de identificação.

#### 5.1.1 Análise do NMP (número mais provável) para a pesquisa de *P. aeruginosa* no caldo acetamida.

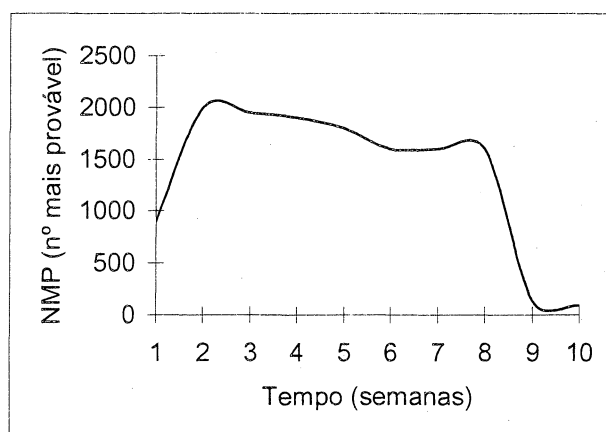
Os resultados encontrados na pesquisa de *P. aeruginosa* no caldo acetamida, considerado como teste confirmativo para a presença de *P. aeruginosa*, foram consultados da tabela de número mais provável (NMP) para *Pseudomonas aeruginosa* em 100 mL de água (TABELA 02).



TABELA 02- VALORES DE NMP (Nº MAIS PROVÁVEL) X  $10^3$  ENCONTRADOS PARA PESQUISA DE *Pseudomonas aeruginosa* NO CALDO ACETAMIDA NAS DEZ SEMANAS DE ANÁLISE.

RIOS	SEMANAS									
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª
Iguaçu	900	≥ 1600	≥ 1600	≥ 1600	≥ 1600	1600	1600	1600	140	90
Iraí	220	≥ 1600	1600	140	1600	240	140	140	170	26
Passaúna	33	≥ 1600	350	500	1600	300	280	170	34	17

FIGURA 03- TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA DE *P. aeruginosa* NA AMOSTRA DO RIO IGUAÇÚ.



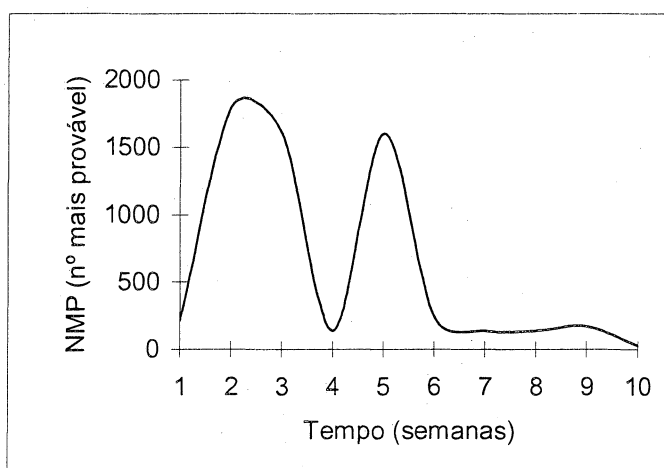
No Rio Iguaçu (FIGURA 03) o padrão de crescimento observado mostra uma fase inicial onde houve um aumento do número de *P. aeruginosa* e, como nos demais rios pode ser explicado pela fase log da curva de crescimento bacteriana, onde a partir de um período inicial de adaptação as células utilizam os nutrientes disponíveis e aumentam seu processo de divisão entrando no processo de crescimento logarítmico. No entanto, nesta fase de crescimento os microrganismos são particularmente sensíveis às mudanças ambientais (TORTORA, 2000).

Pelo fato do Rio Iguaçu ser um muito poluído e conseqüentemente “rico” em nutrientes orgânicos e inorgânicos para *P. aeruginosa*, não foi observado decréscimo

acentuado no número destas bactérias na terceira ou quarta semana, como foi observado nas barragens do rio Irai e Passaúna.

A partir da oitava semana houve uma diminuição gradativa do número de *P. aeruginosa* nos rios Irai e Passaúna explicada pela autodepuração natural das mesmas devido ao esgotamento de nutrientes na amostra.

FIGURA 02- TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA DE *P. aeruginosa* NA AMOSTRA DO RIO IRAÍ.



Na barragem do rio Iraí (FIGURA 02), foi possível observar um aumento no número mais provável de colônias comparando os valores observados na primeira e na segunda semana (220 /  $\geq 1600$ ).

Isso pode ser explicado pela fase lag da curva de crescimento bacteriano, onde pode ser observado pouco ou nenhum processo de divisão celular. A partir de um período inicial de adaptação metabólica as células aumentam seu processo de divisão entrando no processo de crescimento logarítmico, chamado de fase log. No entanto, nesta fase de crescimento os microrganismos são particularmente sensíveis às mudanças ambientais (TORTORA, 2000).

A queda na curva observada na quarta semana (FIGURA 02) pode ser atribuída a autodepuração natural dessas bactérias pela diminuição no nível de oxigênio e recursos disponíveis. Essa queda na população de *Pseudomonas aeruginosa* coincidiu

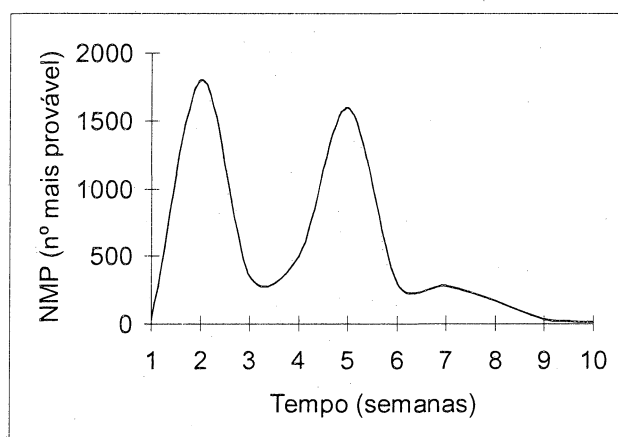
com a diminuição da quantidade de coliformes totais e fecais os quais estavam em fase de declínio (ANEXO 1). Isso pode indicar que as *Pseudomonas* poderiam estar usando os coliformes como recurso, e com a diminuição desse recurso houve diminuição na sua população.

Segundo BRANCO, (1986) em águas poluídas a população de bactérias aeróbias se alimentam da matéria orgânica, utilizando, para sua oxidação ou respiração, o oxigênio dissolvido no meio, o qual começa a reduzir até os 40% de saturação. Nesta fase os teores de dióxido de carbono e complexos nitrogenados estão altos.

Na quinta semana (FIGURA 02) o novo aumento na curva de sobrevivência (140/1600) pode ser explicado pela capacidade da *Pseudomonas aeruginosa* metabolizar mais de cem tipos de substâncias orgânicas e inorgânicas incluindo compostos aromáticos, derivados halogenados e resíduos orgânicos (ANDREW et al., 2000) e também pela utilização do  $\text{NO}_3$  como aceptor final de elétrons em situações de baixa concentração de oxigênio (BANNING et al., 2003).

A partir da sexta semana foi observada uma queda gradativa no número de bactérias devido à autodepuração natural das mesmas (FIGURA 02). O pequeno aumento observado na nona semana provavelmente foi devido à disponibilidade de algum metabólito de degradação complexa, que exigiu um maior tempo para a adaptação das bactérias.

FIGURA 03- TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA DE *P. aeruginosa* NA AMOSTRA DO RIO PASSAÚNA.



Na barragem do rio Passaúna (FIGURA 03) a curva de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* é muito semelhante à observada na barragem do rio Iraí, porém a queda na curva de crescimento aconteceu na terceira semana. Diferentemente do observado na barragem do rio Iraí, na barragem do rio Passaúna a queda no número de *Pseudomonas* aconteceu antes da quarta semana.

Isto pode ser explicado pelo fato de que na terceira semana o número de bactérias do grupo coliforme nesta amostra foi praticamente zero (ANEXO 01) e com isso houve uma diminuição na disponibilidade de nutrientes para a *P. aeruginosa*.

#### 5.1.2 Análise das provas bioquímicas da citocromo-oxidase e catalase para confirmação da identificação de *P. aeruginosa*

TABELA 03- PROVAS BIOQUÍMICAS DA CITOCROMO-OXIDASE PARA CONFIRMAÇÃO DE *P. aeruginosa* ISOLADAS NAS ÁGUAS AMOSTRADAS NOS RIOS IGUAÇU, IRAÍ E PASSAÚNA.

RIOS	SEMANAS									
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
Iguaçu	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Iraí	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Passaúna	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

Através da prova da citocromo-oxidase (TABELA 03), foi possível observar resultado positivo nos isolamentos realizados na primeira semana nos Rios Iguaçu e Iraí, na segunda semana no Rio Iguaçu, nas terceira, quarta e oitava semana nos três rios, na quinta semana nos Rios Iraí e Passaúna, na sexta e sétima semanas nos Rios Iguaçu e Passaúna e, na nona semana no Rio Iguaçu. Estes resultados obtidos confirmam o perfil bioquímico da *Pseudomonas aeruginosa*.

TABELA 04- PROVAS BIOQUÍMICAS DA CATALASE PARA CONFIRMAÇÃO DE *P. aeruginosa* NAS ÁGUAS AMOSTRADAS NOS RIOS IGUAÇU, IRAÍ E PASSAÚNA.

RIOS	SEMANAS									
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
Iguaçu	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Iraí	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Passaúna	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

Resultado semelhante ao observado na prova da citocromo-oxidase pode ser visualizado na prova da catalase (TABELA 04), onde foi possível observar resultado positivo nos isolamentos efetuados na primeira semana nos Rios Iguaçu e Iraí, na segunda semana no Rio Iguaçu, nas terceira, quarta e oitava semana nos três rios, na quinta semana nos Rios Iraí e Passaúna, na sexta e sétima semanas nos Rios Iguaçu e Passaúna e, na nona semana no Rio Iguaçu. Da mesma forma como para a prova da citocromo-oxidase, o resultado positivo para a prova da catalase confirma o perfil bioquímico da *Pseudomonas aeruginosa*.

No rio Iguaçu na quinta e décima semana, mesmo com os resultados confirmativos para *Pseudomonas aeruginosa* no caldo acetamida (TABELA 02), as provas bioquímicas da citocromo-oxidase (TABELA 03) e da catalase (TABELA 04), não confirmaram o seu perfil bioquímico. Isto pode ser explicado pela presença de outros tipos de bactérias que utilizam a acetamida como fonte de carbono e nitrogênio. Na barragem do rio Iraí essa mesma condição foi observada na segunda, sexta, sétima, nona e décima semana. E na barragem do rio Passaúna na primeira, segunda, nona e décima semana.

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que não produzem piocianina, podem ter características bioquímicas aberrantes e sua identificação pode ser problemática (LENNETTE, 1989).

As amostras onde os resultados destas duas provas foram positivos possuem maior probabilidade de conterem *P. aeruginosa*.

#### 5.1.3 Amostras semeadas em meio P.

Todas as amostras foram semeadas em meio P (item 4.2.3) para intensificar a produção de pigmento que caracteriza a *Pseudomonas aeruginosa*.

Na terceira semana foi observada a produção de pigmento azul-esverdeado nas amostras da barragem do rio Passaúna. Na quarta semana também foi observada a produção de pigmento azul-esverdeado em amostras do rio Iguaçu e nas barragens dos rios Iraí e do rio Passaúna.

### 5.2 ANÁLISE DOS COLIFORMES TOTAIS E COLIFORMES FECALIS

Pela técnica da membrana filtrante foi possível observar a presença de coliformes totais até a sétima semana no rio Iguaçu, até a quinta semana na barragem do rio Iraí e na barragem do rio Passaúna estes foram detectados apenas nas duas primeiras semanas (ANEXO 1).

Os coliformes fecais puderam ser detectados até a quinta semana no rio Iguaçu e na barragem do rio Iraí, e até a segunda semana na barragem do rio Passaúna.

As amostras de água do rio Iguaçu apresentaram uma maior contaminação por bactérias quando comparadas as amostras dos demais rios. Isto pode ser explicado pelo fato de que as amostras dos rios Iraí e Passaúna foram coletadas na barragem, onde o nível de oxigenação é menor dificultando a sobrevivência destas bactérias.

Outra possível explicação é o fato de que o rio Iguaçu é mais “rico” em matéria orgânica e com isso há uma maior disponibilidade de recursos para as bactérias.

As amostras da barragem do rio Passaúna apresentaram menor número e tempo de sobrevivência de coliformes, sendo estes observados somente até a segunda semana. Uma possível explicação para este fato é que na terceira foi possível observar a produção de piocianina pela *P. aeruginosa* na amostra de água do rio Passaúna e, segundo D'AGUILLA (1993), é considerada inibidor do grupo coliforme.

BANNING et al. (2003) mostraram que a adição de matéria orgânica na água pode estimular o desenvolvimento de biofilmes e pode ter um efeito prejudicial na sobrevivência de bactérias como *E. coli* e favorecer o crescimento de *P. aeruginosa* devido a sua capacidade de competir mais efetivamente por nutrientes com a população microbiana aquática.

Em BANNING et al. (2003) foi feita a comparação entre a sobrevivência das duas bactérias em biofilmes e constatou-se que a *P. aeruginosa* persistiu por mais tempo do que a *E. coli*. Estes resultados concordam com os resultados obtidos nesta pesquisa, pois constatou-se que o tempo de sobrevivência de *Pseudomonas aeruginosa* em água é de aproximadamente sessenta e três dias, enquanto que a *Escherichia coli* permaneceu nas amostras de água do rio Iguaçu e da barragem do rio Iraí por aproximadamente vinte e oito dias, e na barragem do rio Passaúna por aproximadamente quatorze dias.

Fatores que comumente limitam a sobrevivência de bactérias na água incluem o baixo nível de nutrientes disponíveis, a falta de oxigênio (para as aeróbicas) como também as atividades competitivas, antagônicas e predatórias da população microbiana indígena (GERBA<sup>7</sup>, apud BANNING, et al. 2003).

### 5.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

O presente trabalho pode ser considerado pioneiro no que diz respeito ao estudo de fungos presentes em amostras de águas dos Rios Iguaçu, Iraí e Passaúna. Por não dispor de uma hipótese prévia a respeito de quais gêneros de fungos seriam encontrados nas amostras de água optou-se por não fazer uma análise estatística dos dados e, evidenciar somente a presença ou ausência dos gêneros nas amostras.

<sup>7</sup>Gerba, C. P. & Goyal, S. M. Pathogen removal from wastewater during groundwater recharge. In *Artificial Recharge of Groundwater*. Boston: T. Asano p. 283-317. 1985

Neste trabalho foi possível identificar 16 (dezesesseis) gêneros de fungos nas amostras de água analisadas, dentre os quais estão *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Scopulariopsis* sp., *Trichoderma* sp., *Cylindrocladium* sp., *Phoma* sp., *Mucor* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fonsecaea* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Bipolaris* sp., *Epicoccum* sp., *Mycelia sterilia* I, *Mycelia sterilia* II, e um fungo dematiáceo não identificado em nível de gênero. No Rio Iguaçu foram detectadas a presença de 8 (oito) desses gêneros, no Iraí 9 (nove), e no Passaúna 5 (cinco).

TABELA 05- NÚMERO DE COLÔNIAS DE FUNGOS ISOLADOS DAS TRÊS ANÁLISES DA AMOSTRA DE ÁGUA DO RIO IGUAÇÚ

Fungos	Amostras		
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
<i>Aspergillus niger</i>	54	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	20	55	68
<i>Mycelia sterilia</i> I	-	13	-
<i>Scopulariopsis</i> sp.	8	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	5	6	11
<i>Phoma</i> sp.	-	3	13
<i>Cylindrocladium</i> sp.	1	-	-
<i>Mucor</i> sp.	1	-	-
TOTAL	89	77	92

NOTA: O algarismo romano após o nome científico indica os diferentes morfotipos encontrados para este gênero.

Na primeira amostra da água do Rio Iguaçu houve predomínio de *Aspergillus niger* sendo observadas 54 (cinquenta e quatro) colônias, e *Penicillium* sp., 20 (vinte) colônias. Foram também encontrados 8 (oito) colônias do gênero *Scopulariopsis* sp., 5 (cinco) colônias do gênero *Trichoderma* sp., 1 (uma) do gênero *Mucor* sp. e 1 (uma) do gênero *Cylindrocladium* sp. Na segunda amostra foram encontrados 55 (cinquenta e cinco) colônias do gênero *Penicillium* sp., 13 (treze) colônias de *Mycelia Sterilia* I, 6 (seis) colônias de *Phoma* sp. e, 6 (seis) colônias do gênero *Trichoderma* sp. Na terceira amostra do Rio Iguaçu foram observadas 68 (sessenta e oito) colônias de *Penicillium* sp., 13 (treze) colônias de *Phoma* sp. e 11 (onze) de *Trichoderma* sp. (TABELA 05).



Comparando as três amostras do Rio Iguaçu foi possível observar que houve um aumento no número de colônias de fungos do gênero *Penicillium* sp. 20, 55, 68 respectivamente. Uma possível explicação para este fato pode ser a capacidade de crescimento relativamente rápida deste fungo (TABELA 05).

Outro ponto observado foi que enquanto os penicílios aumentaram, a maioria dos demais fungos diminuíram (TABELA 05). Isso pode ser atribuído a capacidade dos penicílios produzirem metabólitos que inibem o crescimento de determinados fungos, ou simplesmente pela competição entre os mesmos.

TABELA 06- NÚMERO DE COLÔNIAS DE FUNGOS ISOLADOS DAS TRÊS ANÁLISES DA AMOSTRA DE ÁGUA DO RIO IRAÍ

Fungos	Amostras		
	1ª	2ª	3ª
<i>Rhizoctonia</i> sp.	8	-	42
<i>Cylindrocladium</i> sp.	8	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	4	-	-
<i>Bipolaris</i> sp.	7	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	2	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	1	-	-
<i>Fonsecaea</i> sp.	1	-	-
Dematiaceos	1	-	-
<i>Acremonium</i> sp.	-	64	19
TOTAL	32	64	61

No Rio Iraí foram encontradas na primeira amostra 8 (oito) gêneros, dentre eles 8 (oito) colônias de *Cylindrocladium* sp., 8 (oito) colônias de *Rhizoctonia* sp., 7 (sete) colônias de *Bipolaris* sp., 4 (quatro) colônias de *Aspergillus niger*, 2 (duas) colônias de *Fusarium* sp., 1 (uma) colônia de *Penicillium* sp., 1 (uma) colônia de *Fonsecaea* sp. e 1 (uma) colônia de fungos dematiáceos. Na segunda amostra deste Rio foram observadas 64 (sessenta e quatro) colônias do gênero *Acremonium* sp. e na terceira análise 42 (quarenta e duas) colônias de *Rhizoctonia* sp. e 19 (dezenove) de *Acremonium* sp. (TABELA 06).

Os fungos predominantes nas amostras da barragem do rio Iraí foram pertencentes aos gêneros *Acremonium* sp. e *Rhizoctonia* sp (TABELA 06)

Podemos supor, pelo fato de que na segunda e terceira amostras foi encontrado um maior número de colônias do gênero *Acremonium* sp. que este se desenvolveu melhor quando havia uma menor diversidade de fungos na amostra, pela diminuição da competição entre as espécies.

TABELA 07- NÚMERO DE COLÔNIAS DE FUNGOS ISOLADOS DAS TRÊS ANÁLISES DA AMOSTRA DE ÁGUA DO RIO PASSAÚNA

Fungos	Amostras		
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
<i>Aspergillus</i> sp.	31	-	-
<i>Mycelia sterilia</i> II	-	-	2
<i>Scopulariopsis</i> sp.	1	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	1	-	-
<i>Epicoccum</i> sp.	-	-	1
TOTAL	33		3

No Rio Passaúna foram observadas 31 (trinta e uma) colônias de *Aspergillus niger*, uma colônia de *Trichoderma* sp. e 1 (uma) de *Scopulariopsis* sp. Na segunda amostra não houve crescimento de colônias, sendo esta amostra repetida duas vezes para confirmação de resultados. Na terceira amostra do Rio Passaúna foi encontrada uma colônia do gênero *Epicoccum* sp. e 2 (duas) colônias *Mycelia Sterilia* II (TABELA 07).

Neste rio o fungo predominante foi pertencente ao gênero *Aspergillus* sp. sendo observado também que o mesmo somente apareceu na primeira amostra.

Colônias do gênero *Aspergillus* foram identificadas somente na primeira amostra dos três rios. A partir desse resultado podemos supor que este fungo não resistiu por muito tempo na água, talvez pelo fato de ser um habitante comum do solo.

Segundo STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1995), os autênticos fungos aquáticos, formadores de zoósporos, não

são adaptados a águas poluídas. Nesta situação são mais comuns os fungos originários do solo, incluindo as leveduras.

Quanto ao resultado de fungos, todos os gêneros encontrados neste trabalho são saprófitas de solo, o que confirma o estado de poluição dos rios em questão, dados estes que concordam com o STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1995).

A população de fungos em água é composta principalmente de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Epicoccum* e *Mucor* (KHALLIL, 1992), o que coincide com alguns gêneros encontrados neste trabalho.

HIREMATH<sup>8</sup> et al. citado por KHALLIL (1992) demonstrou que *A. flavus*, *A. Niger*, e *Penicillium oxalicum* aparecem constantemente em percentuais altos em águas residuais e lagoas. As fontes mais prováveis destes fungos terrestres são os animais ou plantas e partículas de solo.

Concordando com os resultados obtidos neste trabalho, WARRIS (2001), observou que águas não tratadas podem conter uma quantidade elevada de fungos filamentosos. Além disso, em águas tratadas, o processo de tratamento é insuficiente para eliminar estes microrganismos, pois a cloração nem sempre tem efeito nos conídios dos fungos.

Para ARVANITIDOU et al. (2000), existe uma predominância de fungos dematiáceos isolados de água potável, mais especificamente *Cladosporium*, *Phoma*, *Alternaria*, e *Aspergillus fumigatus*. Segundo o mesmo autor, fungos filamentosos possuem distribuição ampla, e são encontrados onde houver matéria orgânica, sendo na maioria das vezes parasitas e facultativamente parasitas. E apesar da larga ocorrência destes organismos, não se tem dado muita importância a sua presença e significados nos meios aquáticos.

<sup>8</sup>HIREMATH, A. B.; PROBHAKAR, M. N.; JAYARI, Y. M. Fungi of waters and stabilizations pond. **Plant Science**. v. 95, p. 263 –270, 1985.

Alguns gêneros encontrados neste trabalho como *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. e *Acremonium* sp. concordam com BRANCO (1986), que cita os gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Geotrichum* como gêneros que freqüentemente, mas não obrigatoriamente crescem em ambientes com poluição orgânica e os gêneros *Acremonium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, entre outros, como gêneros que toleram a poluição orgânica, mas que normalmente não vivem nestes ambientes.

Em ARVANITIDOU et al. (2000), foi confirmada correlação significativa entre o total de fungos e a maioria das bactérias indicadoras de poluição, dados que concordam com o trabalho de SEIDLER<sup>9</sup> et al. citado por ARVANITIDOU et al. (2000) que observou que algumas bactérias podem crescer no micélio do fungo se protegendo dos desinfetantes e obtendo nutrientes.

Concordando com ARVANITIDOU et al. (2000), neste trabalho, foram identificados um total de dezesseis gêneros, dos quais 8 (oito) foram observados no rio Iguaçu, 9 (nove) na barragem do rio Iraí e 5 (cinco) na barragem do rio Passaúna. Ou seja, nas águas do rio Iguaçu e na barragem do rio Iraí onde a presença de bactérias indicadoras de poluição foi maior em relação à barragem do rio Passaúna (ANEXO 1) foi observado uma maior quantidade de gêneros de fungos.

Essa diferença na riqueza de gêneros também pôde ser observada quando comparamos as três amostras de cada Rio. Nos três rios, houve maior número de gêneros na primeira amostra (seis na amostra do rio Iguaçu, oito na amostra do rio Iraí e três na amostra do rio Passaúna) a qual foi realizada na mesma semana onde também foram observados os maiores valores de NMP (nº mais provável) de coliformes totais e fecais (ANEXO 1).

BRANCO (1986), cita que alguns fungos podem testemunhar a presença de material fecal na água, uma vez que, durante uma fase de sua vida, pelo menos, viveram obrigatoriamente no ambiente intestinal de animais herbívoros como é o caso do gênero *Mucor* sp., encontrado em uma amostra do rio Iguaçu (TABELA 05).

<sup>9</sup>SEIDLER, R. J.; MORROW, J. E.; BAGLEY, S.T. Klebsiellae in drinking water emanating from redwood tanks. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 33, p. 893-900, 1977.

A análise de rios e de redes de tratamento de água revela que não é comum encontrar fungos patogênicos ao homem e aos demais vertebrados mesmo em águas poluídas, porém esta hipótese não pode ser totalmente descartada (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995).

ARVANITIDOU et al., (2000) observou que os fungos são habitantes naturais do solo e água e que algumas espécies podem se tornar patogênicas ou oportunistas ao homem. Fungos patogênicos são agentes de uma variedade de infecções, e parte destas são mais freqüentemente observadas em pacientes imunocomprometidos. Como é o caso dos gêneros *Fonsecaea* sp. isolado na amostra de água da barragem do rio Iraí e o gênero *Aspergillus* sp., isolado nas amostras dos três rios, que podem ser considerados patogênicos ao homem.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos concluiu-se que os coliformes totais tiveram seu maior tempo de sobrevivência observado no rio Iguaçu onde permaneceram viáveis por sete semanas. Os coliformes fecais apresentaram um tempo de sobrevivência relativamente menor, sendo encontrados até a quinta semana.

*Pseudomonas aeruginosa*, considerada um patógeno oportunista foi encontrada por aproximadamente sessenta e três dias, pela capacidade de metabolizar uma gama maior de substâncias, utilizar diferentes substratos para sua sobrevivência e, conseqüentemente capaz de tolerar diferentes condições ambientais.

Com relação aos fungos, a maioria dos gêneros encontrados neste trabalho são comuns no solo, sendo encontrados nas três amostras um total de dezesseis gêneros. Na amostra da barragem do rio Iraí foi identificado um maior número de gêneros de fungos, sendo identificados nove gêneros de 152 colônias isoladas. Na amostra do rio Iguaçu foram identificados oito gêneros e o número de colônias isoladas foi maior que nas demais amostras, sendo isoladas 258 colônias. O número de gêneros isolados do rio Passaúna foi menor em relação aos demais rios, sendo isoladas 33 colônias de cinco gêneros.

A partir dos resultados encontrados na pesquisa dos fungos foi possível identificar um maior número de gêneros de fungos de solo em amostras onde a análise bacteriológica revelou haver um maior número de coliformes totais e fecais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA: **Portarias**. Disponível em:< [http://www.anvisa.gov.br/portarias/518\\_00.html](http://www.anvisa.gov.br/portarias/518_00.html)> Acesso em: 30 mai 2004

AINSWORTH, C. C.; SPARROW, F. K.; SUSSUMAN, A. S. **The fungi**. New York: Academic Press, v.4a, 1973.

ANDERSEN, J. B.; KOCH, B.; NIELSEN, T. H.; SORENSEN, D.; HANSEN, M.; NYBROE, O.; CHRISTOPHERSEN, C.; SORENSEN, J.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. **Microbiology**. v. 149, p. 37-46, 2003.

ANDREW, J. S.; ANGUS, B.; PAUL, B. R. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**. v. 146, p. 2345-2350, 2002.

ARVANITIDOU, M.; KANELLOU, K.; KATSOUYANNOPOULOS, V.; TSAKRIS, A. Occurrence and densities of fungi from northern Greek coastal bathing waters and their relation with faecal pollution indicators. **Water Research**. v. 36, p. 5127-5131, 2002.

ARVANITIDOU, M.; SPIA, S.; VELEGRAKI, A.; PAZARLOGLOU, M.; KANETIDIST, D.; PANGIDIST, P.; ASKEPIDIS, N.; KATSINAS, C.; VAYONAST, G.; KATSOUYANNOPOULOS, V. High level of recovery of fungi from water and dialysate in hemodialysis units. **Journal of Hospital infection**. v. 45, p. 225-230, 2000.

ARX, J. A. VON.; **The genera of fungi sporulation in pure culture**. 2 ed. Vaduz: J. Cramer, 1974.

BANNING, N.; TOZE, S.; MEE, B. J. Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. **Microbiology**. v. 149, p. 47-55, 2003.

BARNETT, H. C.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3 ed. Mineapolis: Burgess Publications, 1972.

BRANCO, S. M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**. 3 ed. São Paulo: CETESB/ ASCETESB, 1986.

CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária**. Itaguaí: UFRJ-Imprensa Universitária, 1981.

D'AGUILLA, P.S. *Pseudomonas* como mais um indicador em análises microbiológicas. **XVII Congresso ABES**. Natal. Tomoll, p.344-50, 1993.

ELLIS, M. B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Surrey, Common health Mycological Institut, 1976.

FUJIKAWA H.; KAI, A. ; MOROZUMI S. A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. **Food Microbiology**. v. 21, p. 501-09, 2004.

GAFFNEY, T. D.; LAM, S. T.; GATES, K.; FRAZELLE, A.; DI MAIO, J.; HILL, S.; GOODWIN, S. TORKEWITZ, N.; ALLSHOUSE, A. M. Global regulation of expression of antifungal factor by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. **Mol Plant Microbe Interact**. v. 7, n. 4, p. 455- 463, 1994.

GORDON, D.M. Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. **Microbiology**. v. 147, p. 1079-1085, 2001.

GRANT, W. D.; LONG, P. E. **Microbiologia Ambiental**. Zaragoza, Espanha: Acribia, S. A., 1989.

HARRISON, S. J.; MOSS, S. T.; JONES, E. B. G. Fungal Adhesion in Aquatic Hyphomycetes. **International Biodeterioration**. v. 24, p. 271-276, 1988.

HENDRY, G. S.; JANHURST, S.; D.; HORSNELL, G. Technical note some effect of pulp and paper wastewater on microbiological water quality of a river. **Water Research**. v. 16, p. 1291-1295, 1982.

KHALLIL, A . M, ABDEL-SATER, A. M. Fungi from Water, Soil and Air Polluted by the Indutrial Effluents of Manquabad Superphosphate Factory (Assiut, Egypt). **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 30, p. 363-386, 1992.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia Médica**. 2ªed. São Paulo: Editora Premier, 1999.

KONEMAN, E. W.; ROBERTS, G. D. **Micologia Prática de Laboratório**. Buenos Aires: Editoria Médica Panamericana, 1987.



KONEMAN, A. J. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. 5 ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, 1999.

LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. New York: Elsevier, 1987.

LENNETTE, B. H. T. **Microbiologia Clínica**. 3 ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, 1982.

OLIVEIRA, E. N. S.; BLASKOWSKI, M. M. M.; OLIVEIRA, E. B. Incidência de *Pseudomonas aeruginosa* em várias fontes naturais. I –Fezes de indivíduos sadios. **Arquivo Biologia e Tecnologia**. v. 26, n. 3, p. 415-418, 1983.

PELCZAR, M. J. Jr. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. v.2. 2.ed. São Paulo: Makrom Books, 1996.

ROITMAM, I. **Tratado de Microbiologia**. v.1. São Paulo: Manole, 1987.

SAVAGEAU, M. A. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. **Am Nat** 122, 732-744, 1983.

STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER: part 9000. **Microbiological Examination**. 19. Ed. Washington, 1995.

SUBERKROPP, K.; MICHELIS, A.; LORCH, H.J.; OTTOW, J. C. G. Effect of sewage treatment plant effluents on the distribution of aquatic hyphomycetes in the River Erms, Schw. Bische Alb, F. R. G. **Aquatic Botany**. v. 32, p.141-153, 1988.

TAN, T. K., LIM, G. A comparison of Fungi from Polluted Water. **Enviromental Pollution**. v. 35, p. 57-65, 1984.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

WARRIS, A.; GAUSTAD, P.; MEIS, J. F. G. M.; VOSS, A.; VERWEIJ, P. E.; ABRAHAMSEN, T. G. Recovery of filamentous fungi from water in a pediatric bone marrow transplantation unit. **Journal of Hospital infection**. v. 47, p. 143-148, 2001.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1 – TABELA DE ANALISE DOS COLIFORMES TOTAIS E FECAIS ..... 43**

**ANEXO 2 – TABELA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL PARA *P. aeruginosa* ..... 44**

**ANEXO 1: ANÁLISE DOS COLIFORMES TOTAIS E FECAIS NO RIO IGUAÇÚ E NAS BARRAGENS DOS RIOS IRAÍ E PASSAÚNA**

Semana	Ponto	Diluição	CT	CF	Data
1	Iraí	—	—	—	—
	Iguaçu	—	—	—	
	Passaúna	—	—	—	
2	Iraí	1:1000	1,2	0,2	06/ out
	Iguaçu	1:1000	91,2	20	
	Passaúna	1:1000	0,001	0,001	
3	Iraí	1:200	<200	<200	10/out
	Iguaçu	1:800	3.200	<800	
	Passaúna	S/D	<1	<1	
4	Iraí	1:50	<50	<50	17/out
	Iguaçu	1:100	600	<100	
	Passaúna	S/D	<1	<1	
5	Iraí	S/D	< 200	< 200	01/nov
	Iguaçu	S/D	11	4	
	Passaúna	S/D	<1	<1	
6	Iraí	S/D	<1	<1	07/nov
	Iguaçu	S/D	1	<1	
	Passaúna	S/D	<1	<1	
7	Iraí	S/D	<1	<1	14/nov
	Iguaçu	S/D	1	<1	
	Passaúna	S/D	<1	<1	
8	Iraí	S/D	<1	<1	21/nov
	Iguaçu	S/D	<1	<1	
	Passaúna	S/D	<1	<1	
9	Iraí	S/D	<1	<1	28/nov
	Iguaçu	S/D	<1	<1	
	Passaúna	S/D	<1	<1	
10	Iraí	S/D	<1	<1	05/dez
	Iguaçu	S/D	<1	<1	
	Passaúna	S/D	<1	<1	

FONTE: SANEPAR

ANEXO 2: TABELA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) PARA *P. aeruginosa*

COMBINAÇÃO DOS TUBOS POSITIVOS	NMP Index / 100 mL	LIMITE DE CONFIANÇA DE 95%		COMBINAÇÃO DOS TUBOS POSITIVOS	NMP Index / 100 mL	LIMITE DE CONFIANÇA DE 95%	
		MÍNIMO	MÁXIMO			MÍNIMO	MÁXIMO
0-0-0	< 2	---	---	4-3-0	27	12	67
0-0-1	2	1	10	4-3-1	33	15	77
0-1-0	2	1	10	4-4-0	34	16	80
0-2-0	4	1	13	5-0-0	23	9	86
1-0-0	2	1	11	5-0-1	30	10	110
1-0-1	4	1	15	5-0-2	40	20	140
1-1-0	4	1	15	5-1-0	30	10	120
1-1-1	6	2	18	5-1-1	50	20	150
1-2-0	6	2	18	5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5	29	5-3-2	140	60	360
3-0-0	8	3	24	5-3-3	170	80	410
3-0-1	11	4	29	5-4-0	130	50	390
3-1-0	11	4	29	5-4-1	170	70	480
3-1-1	14	6	35	5-4-2	220	100	580
3-2-0	14	6	35	5-4-3	280	120	690
3-2-1	17	7	40	5-4-4	350	160	820
4-0-0	13	5	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7	45	5-5-1	300	100	1300
4-1-0	17	7	46	5-5-2	500	200	2000
4-1-1	21	9	55	5-5-3	900	300	2900
4-1-2	26	12	63	5-5-4	1600	600	5300
4-2-0	22	9	56	5-5-5	>1600	---	---
4-2-1	26	12	65				

FONTE: STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995.